

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМ. ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»



МАЗУРЕНКО ВІКТОРІЯ РАДІОНІВНА

УДК 618.19-002:616.98

**КОМПЛЕКСНА БІОТЕХНОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА КОНТАГІОЗНОГО
МАСТИТУ КОРІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі мікробіології та імунології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та в науково-дослідному департаменті ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики».

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач лабораторії імунобіології
відділу молекулярної імунології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Білявська Людмила Олексіївна
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, провідний науковий співробітник
відділу загальної та ґрунтової мікробіології

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Солдаткін Олександр Олексійович
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, провідний науковий співробітник
відділу біомолекулярної електроніки

Захист відбудеться 14 травня 2021 р. об 11⁰⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, просп. Перемоги, 37, корпус 4, аудиторія 258.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, просп. Перемоги, 37.

Автореферат розісланий «12» квітня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої Д 26.002.28
д.т.н., доц.



Н. Б. Голуб

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Біотехнологія - сфера, що швидко розвивається, і в галузі біологічних досліджень та в сільському господарстві. З'являються найсучасніші програми контролю якості продуктів сільського господарства, щоб ці програми були комерційно вигідними, попит на їх розробку повинен надходити від споживачів [Clark, B. et al 2016]. Біотехнологія в сільськогосподарському застосуванні належати до ряду біологічних інструментів, які використовують живі процеси, організми, системи для виготовлення або модифікації продуктів та технологічних схем, вдосконалення рослин і тварин, розвитку мікроорганізмів для сільськогосподарського використання, а також контролю якості продуктів та діагностики різних патологій сільськогосподарських тварин і рослин [Ufer, D. et al., 2019]. У зв'язку з тим, що ефективність молокопереробних підприємств, задоволеність споживачів високим рівнем якості молочних продуктів, розширення асортименту лінійки молочних продуктів залежить від якості молока корів [Frewer, L.S. et al. 2014, Carlson, D.F. et al. 2016]. На сьогоднішній день однієї з основних проблем біотехнології молокопереробного підприємства є умовно-патогенні бактерії, які ідентифікують в молоці корів. Одним із основних методів дослідження є загально відомий мікробіологічний аналіз молока, що дозволяє вирішити, які збудники циркулюють на господарстві, провести санітарну оцінку, як у сирому молоці, так і в молочних продуктах [Parajuli, A. et al 2018, Cruzado-Bravo, M. L et al 2020].

На сьогодні спостерігається помітна тенденція до зростання захворюваності корів маститами через відсутність ефективних засобів для діагностики контагіозного маститу. В першу чергу це пов'язано з тим, що в більшості господарств України протимаститні програми націлені на лікування клінічних форм маститу та зацікавленість у впровадженні повноцінної програми по профілактиці контагіозних маститів не знаходить підтримки керівництва господарств України [Роман, Л. Г. et al 2019, Угнівенко, А. М. et al 2016]. Завдяки тому, що біотехнологічні розробки покращують проведення діагностичних процедур та збільшують стійкість до хвороб молочної залози корів, зменшення вживання антибіотиків та смертності, прорив в біотехнології можуть задовольняти потреби споживачів через поліпшення добробуту корів та покращення якості молока [Семьянова, Е. С. et al 2015].

З огляду на це, важливо оцінити вплив збудників клінічного і субклінічного маститу на українських фермах та рекомендувати профілактичні заходи для зменшення випадків захворювання.

Одним із підходів до розв'язання цієї проблеми є створення нових біотехнологічних методів діагностики. У закордонній літературі наявна значна кількість наукових праць, присвячених вивченню етіології, патогенезу, профілактиці та лікуванню різних форм маститів у корів [Gussmann, M. et al., 2019, Hogan J. et al 2012]. Тому, важливо оцінити вплив збудників клінічного і субклінічного маститу на українських фермах та рекомендувати профілактичні заходи для зменшення випадків захворювання. Враховуючи біотехнологічну вагу цього питання, вивчення контагіозного маститу на рівні стада має вирішальне

значення для розробки можливих стратегій його профілактики та контролю, тому що мастити не тільки знижують продуктивність корів, але і призводять до погіршення хімічного складу і якості молока.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційне дослідження виконане на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Т. Шевченка в межах бюджетної наукової теми №16 БФ036-01 «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527) та в науково-виробничому департаменті ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики» в м. Київ у рамках сумісної теми дисертаційного дослідження.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження було вдосконалення біотехнологічних засобів діагностики контагіозного маститу в корів шляхом застосування комплексних біологічних методів дослідження.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Визначити етіологію маститу корів на території України;
2. Проаналізувати чутливість та антибактеріальну резистентність збудників до антимікробних препаратів;
3. Виявити ДНК *Mycoplasma bovis*, поширеного на молочно-товарних фермах України;
4. Визначити граничну кількість соматичних клітин у молоці, яка сигналізує про наявність у корів маститу;
5. Впровадити визначення ферменту лактатдегідрогенази, як допоміжного аналізу для визначення контагіозних субклінічних маститів.

Об'єкт дослідження — секрет вимені корів та ізоляти мікроорганізмів;

Предмет дослідження — закономірності існування умовно-патогенних мікроорганізмів та взаємозв'язок розвитку запалення молочної залози корів

Методи дослідження — бактеріологічні (культуральний висів), молекулярні дослідження (полімеразно-ланцюгова реакція), імунологічні (протокова цитометрія), біохімічні дослідження (ферментативні реакції), статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше удосконалено науковий підхід моніторингу статусу здоров'я вимені корів на наявність субклінічного запалення. Встановлено, що внаслідок контролю контагіозних збудників на фермі покращиться якість молока корів.

Було проведено визначення ферменту лактатдегідрогенази, як допоміжного біомаркера запалення молочної залози та обґрунтовано комплексне поєднання біологічних методів дослідження для визначення інфекційних збудників у секреті вимені корів.

Практичне значення одержаних результатів. У дисертаційній роботі отримані результати забезпечують необхідною інформацією для вдосконалення методів діагностики та впровадження комплексних підходів до профілактики захворювання. Встановлено, що інформація про наявність умовно-патогенних збудників дозволить оперативно оцінювати епізоотичну ситуацію для впровадження адекватної схеми вакцинопрофілактики, оцінювати ефективність профілактичних засобів для запобігання розповсюдженню збудників на фермах.

Матеріали дисертаційної роботи можуть бути використані при розробці практичних рекомендацій з питань діагностики та профілактики контагіозних маститів корів. Результати досліджень використані для розробки рекомендацій комплексного підходу до діагностики маститу корів впроваджені в протокол роботи ТОВ “Центру ветеринарної діагностики” (м. Київ).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою авторки. Розробка плану експерименту та його реалізація, отримання експериментальних даних, їхнє узагальнення, інтерпретація здійснені авторкою особисто на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом проф. Колибо Д. В. Автором проаналізовано поширення бактеріальних ізолятів виділених з молока корів у 2015-2016 рр. на території України досліджено разом із директором Центру ветеринарної діагностики Собко І. О. Лабораторну діагностику маститу ВРХ методом ПЛР та бактеріологічними методами проведено в Центрі ветеринарної діагностики самостійно під керівництвом Собко І. О. Розробка схем дослідження контагіозних маститів проведений автором особисто на кафедрі мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом наукового керівника Колибо Д. В.

Апробація результатів досліджень. Основні результати дослідження були неодноразово оприлюднені на ряді всеукраїнських і міжнародних наукових з'їздів, конференцій таких як: Фундаментальні та прикладні дослідження в біології 2014 р. лютий 23-24, Імунологія та алергологія. Мікробіологія та імунологія перспективи розвитку в XXI столітті, 2014 квітня 10-11, II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century, 2016 April 14-15; Київ, Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 робіт, з них 3 статті у фахових наукових виданнях (з них 1 – у виданнях, що входять до країн Євросоюзу, 5 тез у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій).

Структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 5 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, 174 списку використаних джерел (найменувань, з них кирилицею – 25, латиницею – 148), 2 додатка на 2 стор.. Загальний обсяг дисертації становить 141 сторінки друкованого тексту, основну частину роботи викладено на 116 сторінках, проілюстровано 10 рисунками, 14 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

У 1 розділі детально описано біологічні, імунологічні та епідеміологічні характеристики збудників маститу корів, наведена актуальна ситуація з

поширення маститу в світі та в Україні. Представлено огляд методів лабораторної мікробіологічної діагностики маститу (культивування зразків молока для виділення збудників, визначення генетичного матеріалу методом ПЛР та імуноцитологічні методи). Проаналізовано доцільність застосування даних методів для різних підходів, їх переваги та недоліки. Висвітлено необхідність та можливі варіанти удосконалення методів. Огляд літератури обґрунтовує доцільність виконання роботи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зразки секрету вимені корів. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з принципами біоетики, законодавчих норм та вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV (2006). *Відбір зразків.* Бактеріологічне дослідження молока корів проводили зі зразків біологічного матеріалу від корів, які надходили на дослідження в ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» у лабораторію бактеріології та патанатомії у період з 2015-2016 р. Для молекулярно-діагностичних досліджень відбір проб молока для аналізу відбувався з ферм України від корів, які мали запалення репродуктивної системи зразки відібрані у період з 2016-2017 р. Визначення активності ферменту лактатдегідрогенази та кількості соматичних клітин проводили за наступною схемою: проби молока для визначення ферменту лактатдегідрогенази та соматичних клітин відбирали від корів породи Джерсей віком 3-5 років. Усі тварини знаходились у другій-третьій фазі лактації. Для визначення ураженої чверті молочної залози застосовували каліфорнійський тест для визначення маститу. У пробах незбираного молока корів визначали концентрацію соматичних клітин експрес-методом: контрольна група — кількість соматичних клітин не перевищувала 200 тис./см³, дослідна група — кількість соматичних клітин знаходилась в межах від 250 тис. до 1 млн. у 1 см³. Після встановлення характеру інфікування протирали кінчик дійок 70 °С спиртом, здоювали перші цівки молочного секрету та асептично відбирали зразок в пластиковий контейнер, відмічали номер корови для подальшого аналізу.

Бактеріологічне дослідження зразків молока. Для виділення з досліджуваних проб молока аеробних бактерій використовували неселективний кров'яний агар *bioMerieux* (Франція). Також для попередньої ідентифікації та селективної ізоляції були використані: агар *Макконкі* (для виділення грамнегативних бактерій), маннітол-солевий агар (як селективне та диференціальне середовище для виділення стафілококів), агар *Едвардса* (для швидкої ізоляції *Streptococcus agalactiae* та інших стрептококів), агар *Сабуро* (для культивування дріжджів, пліснявих грибків) (Індія та Італія). За допомогою мікродозатора вносили 0,1 мл. зразку молока, розподіляли його за фламбованою петлею штрихом по поверхні агару та інкубували в термостаті упродовж 12-18 годин. Після інкубування проводили фарбування бактерій за методом Грама для підтвердження однорідності культури, якщо бактеріальна культура змішана, то проводили виділення чистої культури бактерій. Для ідентифікації в агарі *Макконкі* бактеріальних ізолятів, характерних для *E. coli*, використовували

MIKRO-LA-TEST® (Чехія). *Coli тест* – це високоспецифічний тест для ідентифікації кишкової палички, заснований на визначенні бета-глюкуронідазної активності та продукції індолу.

Проведення аналізу на антибіотикочутливість бактерій. Після виділення чистої бактеріальної культури вносили їх у відповідне поживне середовище або фізіологічний розчин для отримання помутніння, еквівалентного 0,5 стандарту мутності МакФарленда (сульфат барію). Стандартний готовий інокулюм перемішували на вихровому змішувачі перед кожним використанням. Для правильного регулювання помутніння використовували білий фон з контрастними чорними лініями або пристрій Денси-Ла-Метер. Інокулюм розподіляли стерильним тампоном максимально рівномірно по поверхні агару. Потім за допомогою фламбованого полум'я пінцету в інокульоване середовище поміщали тестові диски з активною речовиною. Інкубували досліджувані матеріали протягом 18 годин за температури 37°C, після чого вимірювали діаметри зон інгібування навколо дисків у міліметрах. Чутливість до АМП виділених ізолятів ідентифікували за допомогою диско-дифузійного метода *in vitro* на агарі Мюлера-Хінтона із застосуванням стандартних комерційних дисків.

Визначення бактерицидної активності. Для визначення бактерицидної дії деззасобу використовували такі тест-штами мікроорганізмів: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus spp.*, *Streptococcus agalactiae*. Культури мікроорганізмів вирощували на скошеному тріптіказо-соєвому агарі упродовж 18-24 год за температури 37°C, після чого проводили змив ізотонічним розчином натрію хлориду та готували завись еквівалентного за оптичним стандартом Мак-Фарленда на 0,5 одиниць. Стандартний готовий інокулюм перемішували на вихровому змішувачі перед кожним використанням. Інокулюм розподіляли стерильним тампоном максимально рівномірно по поверхні агару. Чашку Петрі ділили на 2 зони: I – зона-контроль, II – зона-дослідний зразок. Інкубували досліджувані матеріали протягом 18 годин за температури 37°C, відтак проводили інтерпретацію результатів досліджень. Оцінку результатів досліджень проводили через 18-24 год. Відсутність росту мікроорганізмів у пробірках вказувала на бактерицидну дію досліджуваного дезінфекційного засобу.

Для виявлення генетичного матеріалу Mycoplasma spp. в зразках молока тест-систему, розроблену в лабораторії молекулярної діагностики ТОВ “Центра Ветеринарної Діагностики”; праймери підбирали до консервативної ділянки за допомогою програми Vector NTI Advanced 10 (Invitrogen, США), аналізуючи їх рівень гомології до матриці, для проведення полімеразної ланцюгової реакції, відібраного шляхом аналізу рівня гомології до обраного шаблону ДНК збудника: F:5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA3; R:5'TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'. Для визначення генетичного матеріалу *Mycoplasma bovis* використовував тест-систему «LSI VetMAX™ Screening Pack Real-Time PCR Kit, респіраторні захворювання жуйних тварин», Франція. Для ПЛР використовували проби молока, надіслані для досліджень від тварин, які мали проблеми з репродуктивним трактом. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації здійснювали у 1,7 % агарозному гелі. Результати, отримані після ПЛР в реальному часі, інтерпретували за допомогою програми Analysys (графіків) термоциклера.

Визначення ферменту лактатдегідрогенази та соматичних клітин в молоці визначали за допомогою експрес набору (PortachekTM США). Тест-смужки діставали пінцетом і опускали у попередньо відібраний зразок (з однієї чверті вимені) на 10 с. Потім смужку діставали, а залишок молока струшували, через 2 хв. порівнювали із кольоровою шкалою на банці виробника.

Проведення протокової цитометрії. Визначення апоптозу та некрозу клітин, виділених з молока проводили на протоковому цитофлуорометрії Coulter Epics XL (Beckman Coulter) з використанням рекомбінантного протеїну Анексин V, міченого флуоресцентною міткою EGFP, що у Са-залежний спосіб специфічно взаємодіє з фосфатидил серином, та етидію броміду (EtBr), що є флуоресцентним ДНК інтеркалятором.

Математичну обробку та статистичний аналіз отриманих даних виконували за допомогою програм Microsoft Excel та Origin 8.0. Нормальність розподілу даних у групах перевіряли за допомогою критерій U-Манна-Уїтні та застосовували параметричний t-критерій Стюдента. Наведено середні значення (M) та стандартне відхилення від середнього (m).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мікробний пейзаж секрету вим'я корів при маститі та визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Був проведений аналіз поширеності маститів у господарствах на території України та визначення бактеріальної етіології маститу. У період 2015-2016 р. було проаналізовано 92 зразки молока хворих на запалення молочної залози корів з 20 фермерських господарств України. Високий показник поширеності патології молочної залози ще раз підтверджує доцільність обраної мети роботи та практичну значущість результатів.

У ході бактеріологічних досліджень ми виділили 65 штамів мікроорганізмів із 92 проб молока від корів, хворих на клінічний і субклінічний мастит: 17 штамів *Streptococcus agalactiae* — 26%, 10 штамів *Staphylococcus aureus* — 15 %, 9 штамів група КНШ *Staphylococcus spp.* — 14% та *E. coli* — 11%. від загальної кількості виділених мікроорганізмів Решту представили *Streptococcus spp.* — 12% (без визначення виду бактерії), *St. parauberis* — 6%, *St. bovis* — 1,5%, *St. uberis* — 3%, *Pasteurella spp* — 1.5 %, *Proteus spp* — 1,5%, *Arcanobacterium pyogenes* — 1,5% від загальної кількості виділених мікроорганізмів та дріжджі роду *Candida spp.* Таким чином, серед загальної кількості виділених мікроорганізмів були 41% — контагіозні збудники, 59% — енвіроментальні збудники маститу корів (Результати зображено на Рис.№1).

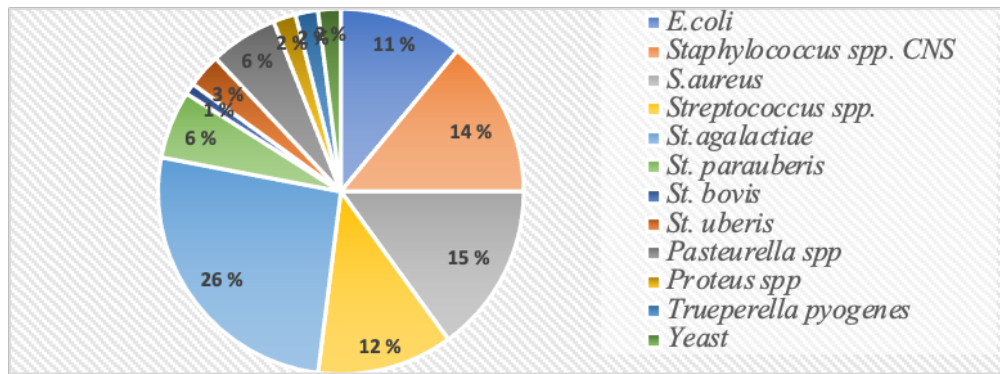


Рис.1. Результати бактеріологічного дослідження проб молока (зразків з ураженої чверті вимені) у корів з клінічною та субклінічною формою *CNS-коагулазо-негативні штами стафілококів

Як видно з даних, наведених у Табл. 1, більшість ізолятів були чутливими до амоксициліну + клавуланової кислоти і гентаміцину – 93, 5%. Найменша кількість ізолятів була чутливою до тилозину – 20,9% та стрептоміцину – 48,3%. Значний відсоток отриманих ізолятів був чутливий до рифампіцину, амоксициліну, бацитрацину, клоксациліну, триметоприму, флорфеніколу, ампіциліну, лінкоміцину, цефалексину, енрофлосацину, неоміцину, пеніциліну.

Таблиця 1

Розподіл загальної кількості збудників маститу за їх чутливістю до діючих речовин антимікробних препаратів

Діюча речовина антибіотика	Кількість чутливих ізолятів
Амоксицилін+клавуланова кислота	58
Гентаміцин	58
Рифампіцин	52
Амоксицилін	50
Бацитрацин	49
Клоксацилін	48
Триметоприм	46
Флорфенікол	42
Ампіцилін	42
Лінкоміцин	41
Цефалексин	41
Енрофлосацин	38
Неоміцин	35
Пеніцилін	34
Стрептоміцин	30
Тилозин	13

Примітка: *% - відсоток чутливих ізолятів стосовно загальної кількості ізолятів ($p < 0.05$ у порівнянні з контрольною групою)

Показана на Рис.2 чутливість до антибіотиків таких контагіозних агентів, як *Staph. aureus* та *St. agalactiae* була приблизно однаковою. Більшість ізолятів контагіозних збудників були чутливими до амоксициліну, амоксициліну +

клавуланової кислоти, гентаміцину, ампіциліну, лінкоміцину, флоксациліну, рифампіцину, бацитрацину, цефалексину та триметоприму; і стійкими до тилозину та стрептоміцину.

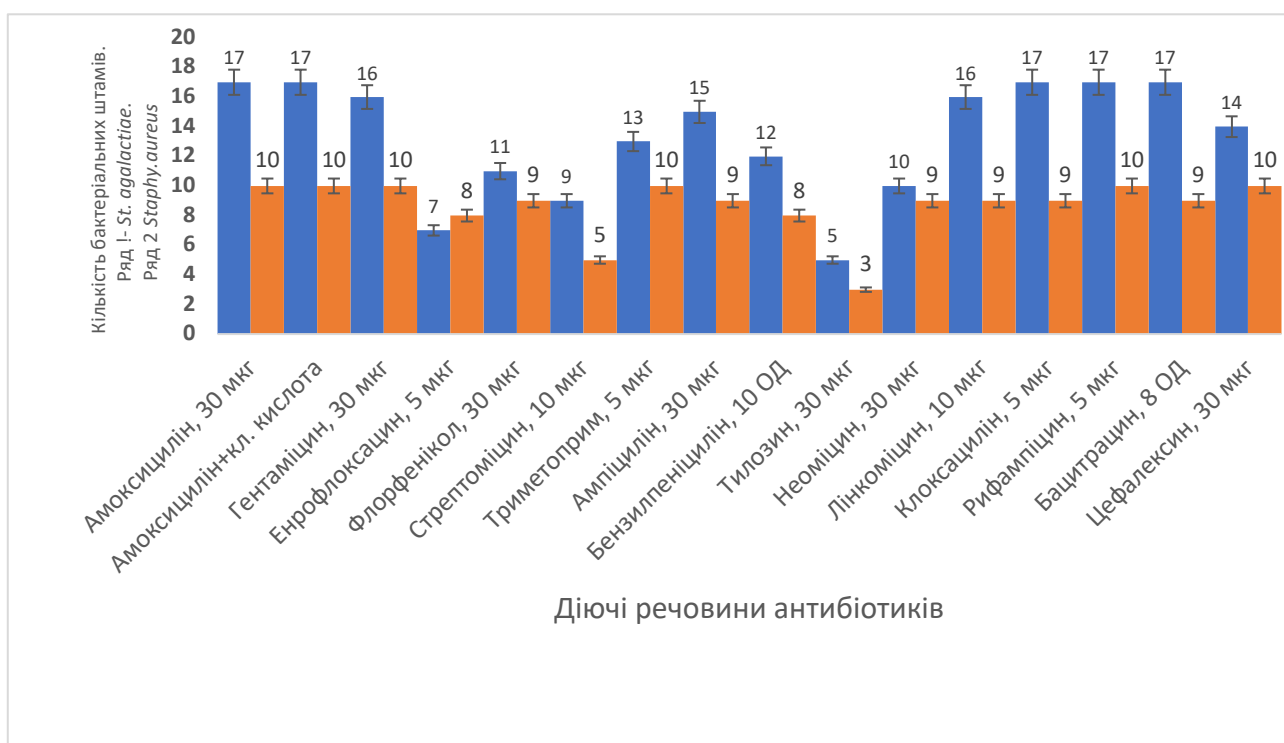


Рис.2. Антибіотична чутливість до контагіозних збудників маститу (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*) критерій Манна-Уїтні =40.5 відмінності рівня ознаки в порівнюваних групах статистично значимі $p < 0.05$.

Дослідження бактерицидного ефекту гігієнічного засобу «Повідонпротект» на основі активного йоду 0.3%, повідон йоду 0.5 % та молочної кислоти 0.5 %, виробник ТОВ «Санвет».

Визначали бактерицидну дію дезінфекційного засобу, виготовленого на основі активного йоду 0,3% (3000 pm), повідон йоду 0,2 % (2000 pm), до тест-штамів мікроорганізмів (зображено на Рис.№ 3) *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* Проаналізовано 150 бактеріальних культур, які були ізольовані від корів із клінічними та субклінічними формами маститу.

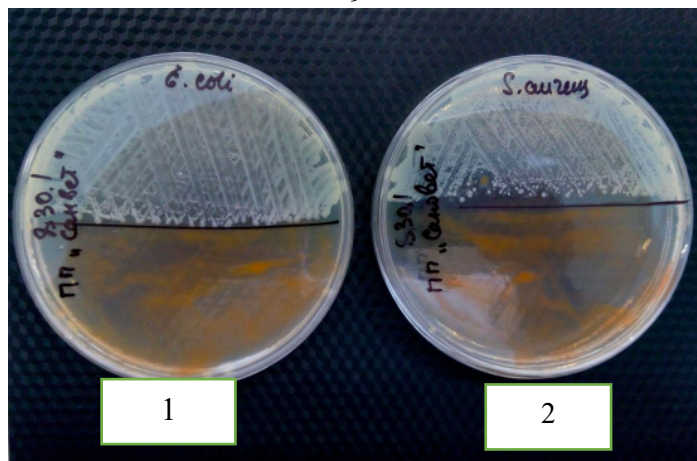


Рис.3. Бактеріостатична дія засобу «Повідонпротект» на основі активного йоду 0,3%, повідон-йоду 0,2 % для обробки шкіри дійок корів після доїння 1. Повне пригнічення росту *E.coli* (ліворуч нижня половина чашки) 2. *Staphylococcus aureus* (праворуч нижня половина чашки).

Було показано, що досліджуваний засіб проявляв 100% бактерицидну дію до тест штамів таких як *Streptococcus agalactiae*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, а от до ізолятів *E. coli* – 75%, *Staphy. aureus* – 70%.

Отже, проведене нами дослідження різноманітності біологічних ізолятів в зразках молока показало, що штами стрептококів, на частку яких припадає 48,5% всіх діагностованих випадків, здатні стати першопричиною виникнення маститу. Серед грамнегативних збудників, що викликають мастит, кишкова паличка (*E. coli*) становить більшість, але стосовно загальної кількості діагностованих маститів відсоток маститів, викликаних кишковою паличкою (*E. coli*), склав всього 11%. Що стосується отриманих даних, то найоптимальнішим антибіотиком є амоксицилін + клавуланова кислота та гентаміцин. Найменш ефективним антибіотиком виявився тилозин.

Враховуючи ситуацію, що деякі бактерії проявляють резистентність до засобів обробки дійок корів існує потреба в регулярному тестуванні чутливості дезінфекційних засобів, оскільки штами ферм можуть стати стійкими та застосування дезінфікуючого засобу не буде ефективним.

Розділ 4 присвячений дослідженню мікоплазмового маститу у корів на господарствах України та контроль поширення *Mycoplasma bovis*.

Аналіз 144 проб молока, отриманих з 20 молочних ферм, виявили наявність ДНК збудника у 61 зразку. (Результати зображені на табл.4 та частина на Рис.4)

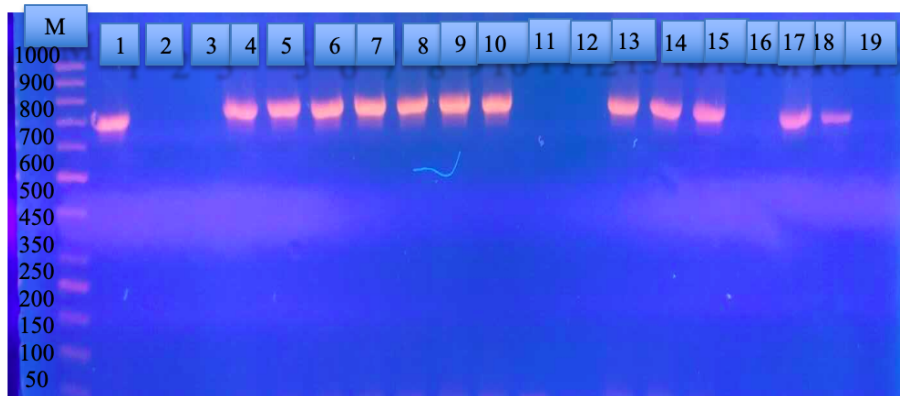


Рис. 4.Електрофореграма продуктів ПЛР: **М** – маркер молекулярних мас, 1 – позитивний контроль, 2 – негативний контроль, 4-10,13-15,17-18 – позитивні зразки на *Mycoplasma spp.* 3,11-12,16,19 – негативні зразки на *Mycoplasma spp.*

Таблиця 4

Виявлення ДНК *Mycoplasma spp.* у різних областях України

Область	Кількість досліджених ферм	Кількість досліджених зразків	Кількість позитивних проб на виявлення <i>Mycoplasma spp.</i>
Полтавська	5	17	4
Харківська	3	16	16
Сумська	1	8	8
Хмельницька	2	11	7
Київська	4	47	9
Вінницька	1	2	2
Миколаївська	1	14	0
Черкаська	3	19	5
Загальна кількість	20	144	61

Далі позитивні зразки були проаналізовані для кількісного визначення вмісту ДНК збудника за допомогою ПЛР в режимі реального часу. Результати цього аналізу представлені в Таблицях 4, 5. Позитивні зразки об'єднувались у збірні зразки відповідно до назви господарства, але не більше 5 одиниць на зразок. Аналіз цих зразків на наявність ДНК *Mycoplasma bovis* виявив ДНК збудника у 10 зразках, отриманих з 15 господарств. Таким чином, результати дослідження патологічного молока на наявність *Mycoplasma spp.* і ДНК *M.bovis* показали, що більшість корів з ідентифікованим генетичним матеріалом збудника в молоці також мали проблеми з інфекційними захворюваннями репродуктивного та респіраторного тракту. Отримані дані дозволяють планувати комплекс профілактичних та лікувальних заходів у господарствах для запобігання зараженню здорових тварин. (Результати зображенні на таб.5).

Результати кількісного визначення генетичного матеріалу *Mycoplasma bovis* у досліджуваному коров'ячому молоці з використанням ПЛР в режимі реального часу (значення Ct)

Область	Кількість досліджених ферм	Кількість досліджених зразків	Кількісне визначення <i>M. bovis</i>
Полтавська	1	2	*Ct=36,98
Харківська	3	5	Ct=24,97
Сумська	1	2	0
Хмельницька	2	3	0
Київська	4	5	Ct=37,97 Ct=24,97 Ct=28,97 Ct=34,17 Ct=22,33
Вінницька	1	2	0
Миколаївська	3	3	Ct=37,97 Ct=25,85 Ct=32,20
Загальна кількість	15	20	10 (позитивних)

Примітка: * Значення «Ct» є відносним показником кількості шуканого генетичного матеріалу в зразку і виражається в циклах від 1 до 35: чим вищий цикл, то меншою є первинна кількість матеріалу в зразку, і навпаки. Ct = 16 - 24 – «+++», Ct = 25-31 – «++», Ct = 32-37 – «+», Ct ≥ 38-40 «+ \-».

Виявлення інфікованих корів, профілактичні заходи у доїльній залі та в приміщеннях з новоприбулими коровами та дотримання порядку доїння – це основні методи профілактики спалахів мікоплазмозу. Кожна ферма у певний період має проблему із захворюваннями молочної залози у корів і кількість інфекцій може збільшуватися, якщо патогенні мікроорганізми, пов'язані з маститом, не будуть вчасно виявлені.

В розділі 5 описано визначення соматичних клітин та лактатдегідрогенази як допоміжних біомаркерів запалення субклінічного маститу в молочній залозі корів. Дані показали, що 2 з 20 проб молока мали низькі значення активності ЛДГ, збільшене число СК (250 000 в 1 мл) та негативні результати бактеріологічних тестів, що може свідчити про відсутність внутрішньовим'яної інфекції та фізіологічне збільшення кількості СК у секреті. При підвищеній активності ЛДГ та рівня СК, що не перевищує 250 000 в 1 мл, виділялися бактерії *Streptococcus agalactiae* або *Staphylococcus aureus*, що свідчить про моноінфекцію. При рівні СК від 250 000 до 500 000 в 1 мл (4 з 20 зразків молока) виділялися бактерії *Streptococcus agalactiae* та *Staphylococcus aureus*, що свідчить про мікс-інфекції. (Результати зображені на таб.№6).

На підставі отриманих даних, можна зробити висновок, що активність ферментів взаємопов'язана зі збільшенням кількості СК в секретії молочної залози. Таким чином, тести на активність ЛДГ дозволяють точніше визначити

наявність запальних процесів у вимені, оскільки кількість СК також може зростати через фізіологічні зміни (стрес тощо).

Таким чином, контроль основних маркерів інфекційного процесу (рівень активності ЛДГ та наявність соматичних клітин у молоці) дозволяє більш точно визначити субклінічний мастит в інфікованому стаді. Аналіз необхідний для виявлення груп ризику та покращення моніторингу якості молока, а також для контролю ефективності профілактичних заходів (вакцинація, лікування вимені спеціальними препаратами до та після доїння тощо). Мікроскопічне дослідження зразків молока від 20 корів показало, що соматичні клітини у зразках були представлені в різних кількостях - від 24740 до 5494800 в 1 мл. У зразках молока виявлено бактерії *Streptococcus agalactiae* (3 з 20 проб) та золотистий стафілокок (1 з 20 проб), що підтверджує субклінічну інфекцію вимені корів. (Результати на таб. №6).

Таблиця 6

Результати виявлення біомаркерів інфекції та проведення мікробіологічного дослідження секретії молочної залози у дійних корів

№ зразка молока	ЛДГ (од /л)	СК (в 1 мл)	Бактеріологічне дослідження
1	< 100	< 100 000	Негативний
2	200–500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
3	100–200	250 000	Негативний
4	< 100	< 100 000	Негативний
5	200–500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
6	200–500	250 000	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	< 100	< 100 000	Негативний
8	200–500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
9	< 100	< 100 000	Негативний
10	< 100	< 100 000	Негативний
11	< 100	250 000	Негативний
12	100–200	250 000	<i>Staphylococcus aureus</i>
13	200–500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
14	200–500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
15	500	500 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
16	500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
17	< 100	250 000	Негативний
18	200–500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
19	< 100	< 100 000	Негативний
20	200–500	250 000	<i>Streptococcus agalactiae</i>
21	< 100*	< 100 000	Негативний контроль
22	> 500 [#]	1 000 000	Позитивний контроль

Примітка: *P<0,05 у порівнянні з негативним контролем; [#]P<0,05 у порівнянні з позитивним контролем

Аналіз молока за допомогою протокової цитометрії для ідентифікації субклінічної інфекції. В результаті нашого дослідження було виявлено одну пробу коров'ячого молока з інфекцією, що містить КСК із 177 744 клітинами / мл молока. (Зображено на Рис.№ 5)

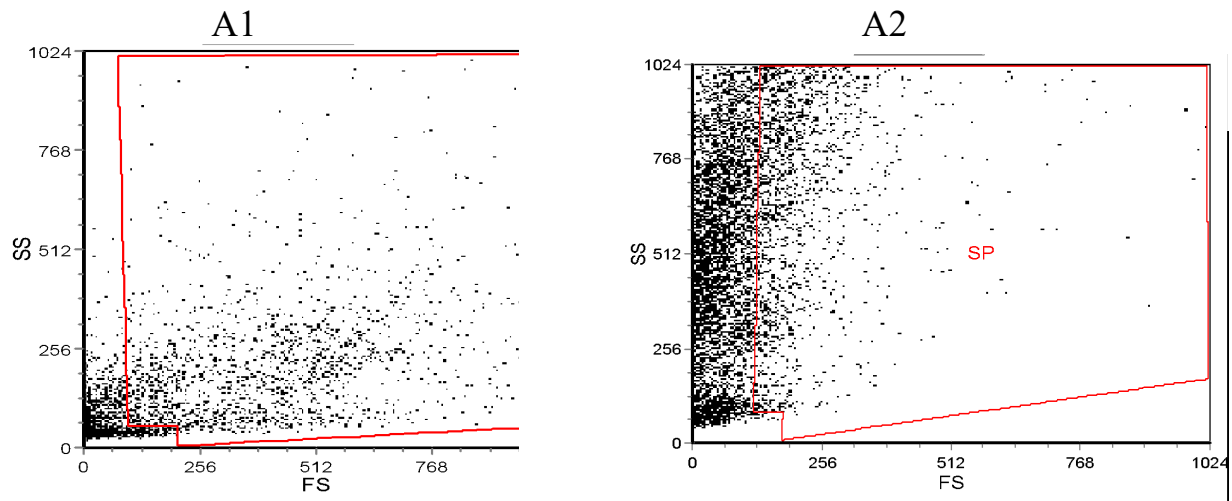


Рис.5. Результати підрахунку соматичних клітин в осаді молока методом мікроскопії

Екстерналізація фосфатидилсерину необхідна для клітин молочної залози, оскільки це своєрідний сигнал для макрофагів у секреті молочної залози, що беруть участь в поглинанні апоптотичних тіл. Наявність фосфатидилсерину у зовнішній мембрані апоптотичних клітин дозволяє Анексину V-EGFP підраховувати кількість клітин за допомогою цитометрії (рис.5). Показано, що при низькому вмісті клітин у молоці вони переважно гинуть внаслідок апоптозу.

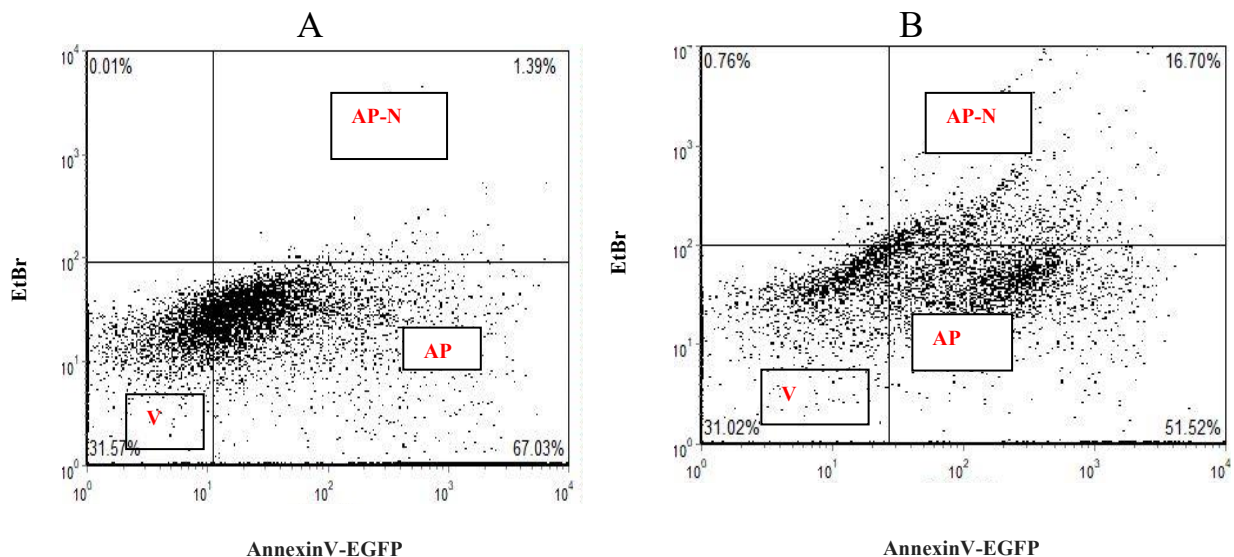
Некротичні клітини СКМ у корови без маститу складала 24% у порівнянні з 67% у корів із маститом. Кількість апоптичних SCC у корови без маститу складала 33% проти 12% у корів з маститом (рис. 5). Можна зробити висновок, що апоптоз тісно пов'язаний з функціональністю нейтрофілів та макрофагів, і відіграє ключову роль у захисті від вторгнення патогенів та фізіології запальної реакції. Наші дослідження дозволяють припустити, що життєздатність соматичних клітин варіюється та залежить від статусу інфекції, часу початку інфікування та лактації.

Можна зробити висновок, що цей метод пропонує можливість протокової цитометричної ідентифікації та кількісної оцінки життєздатних, апоптичних та некротичних соматичних клітин молока для виявлення прихованого маститу у корів. Але необхідні подальші дослідження для визначення нейтрофілів та моноцитів при інфекціях в молочній залозі, оскільки ця інформація може виявитися корисною, особливо для оцінки корів у пізній лактації та відразу після отелу, коли нейтрофіли можуть бути підвищені фізіологічно.



SP * -стандартні популяційні клітини, які аналізували за допомогою проточної цитометрики, щоб виключити дебріс

Рис.6. Точковий графік інтенсивності флуоресценції зразків молока, відібраних у корів із субклінічним маститом, та корів без маститу. Проточна цитометрія молочних клітин, виділених від корів (A1) з низьким вмістом соматичних клітин (100660 клітин / мл) та з високим рівнем соматичних клітин (5494800 клітин / мл) (A2). Розподіл клітин за бічним (Side Scatter, SS) та прямим (Forward Scatter, FS) світлорозсіюванням, що характеризують гранулярність і розміри клітин відповідно.



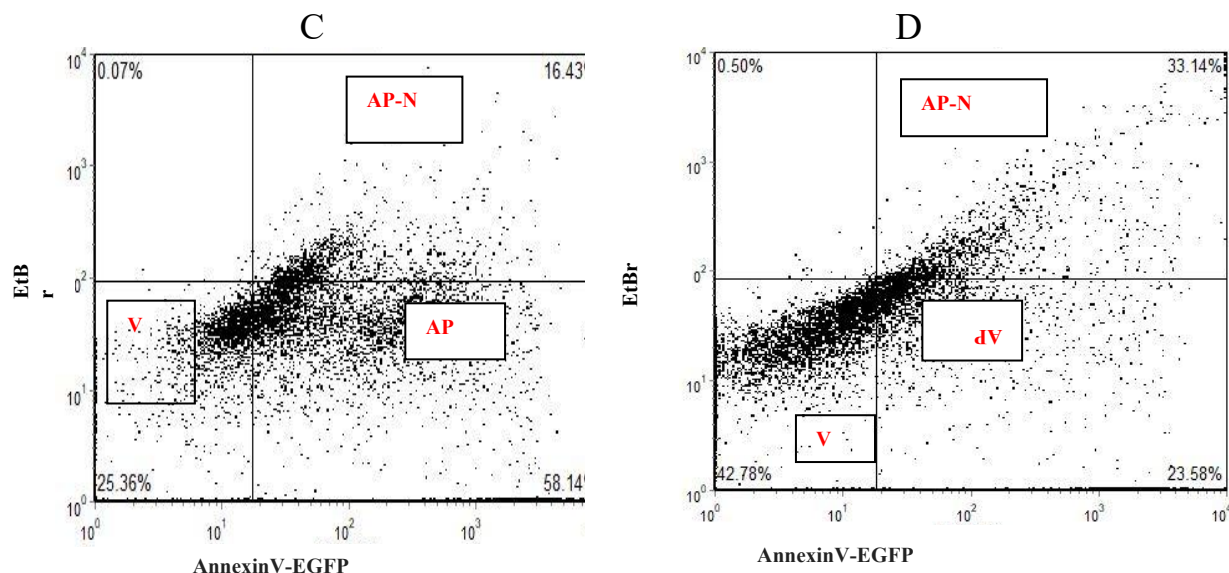


Рис.7. Точковий графіки типового експерименту для визначення апоптозу та некрозу молочних клітин із субклінічним маститом корів, де представлені V-живі клітини (EGFP- / EtBr -), апоптозні клітини V-AP-клітини (EGFP + / EtBr -) та клітини з вторинним некрозом AP-N (EGFP + / EtBr+) **А**-Зразок молока з міксіінфекцією, **В**-Зразок молоко з моноінфікуванням 1, **С**-Зразок молоко з моноінфікуванням, **Д**-контрольний зразок (молочна залоза без маститу)

Отже, розробка **комплексної діагностики контагіозних маститів** великої рогатої худоби є перспективним напрямом у біотехнології та профілактиці розповсюдження патогенних збудників, тому ми пропонуємо удосконалений алгоритм комплексної діагностики контагіозного маститу ВРХ.

1. Для перевірки корів на предмет інфікування контагіозними збудниками на рівні стада необхідно один раз на місяць регулярно відбирати проби молока для ПЛР-аналізу та бактеріологічного дослідження із загальної цистерни (танкера) з молоком (**Схема № 1**);

2. Для перевірки корів на рівні групи слід використовувати комплексний біотехнологічний алгоритм відбору проб для мікробіологічної діагностики маститу корів, який полягає у застосуванні комплексу методів дослідження, що ґрунтуються на визначенні клінічних ознак захворювання (органолептичні зміни та рН молока), використанні експрес тестів для визначення лактатдегідрогенази в сирому молоці та паралельному визначенні соматичних клітин, що допомагає встановити характер розвитку запального процесу (**Схема № 2**);

3. Для мікробіологічної діагностики пропонуємо різні підходи.

Підхід 1. Для встановлення циркуляції контагіозних бактеріальних збудників маститу рекомендуємо відбирати мінімум 10 індивідуальних проб молока від корів, хворих на субклінічну та клінічну форми маститу.

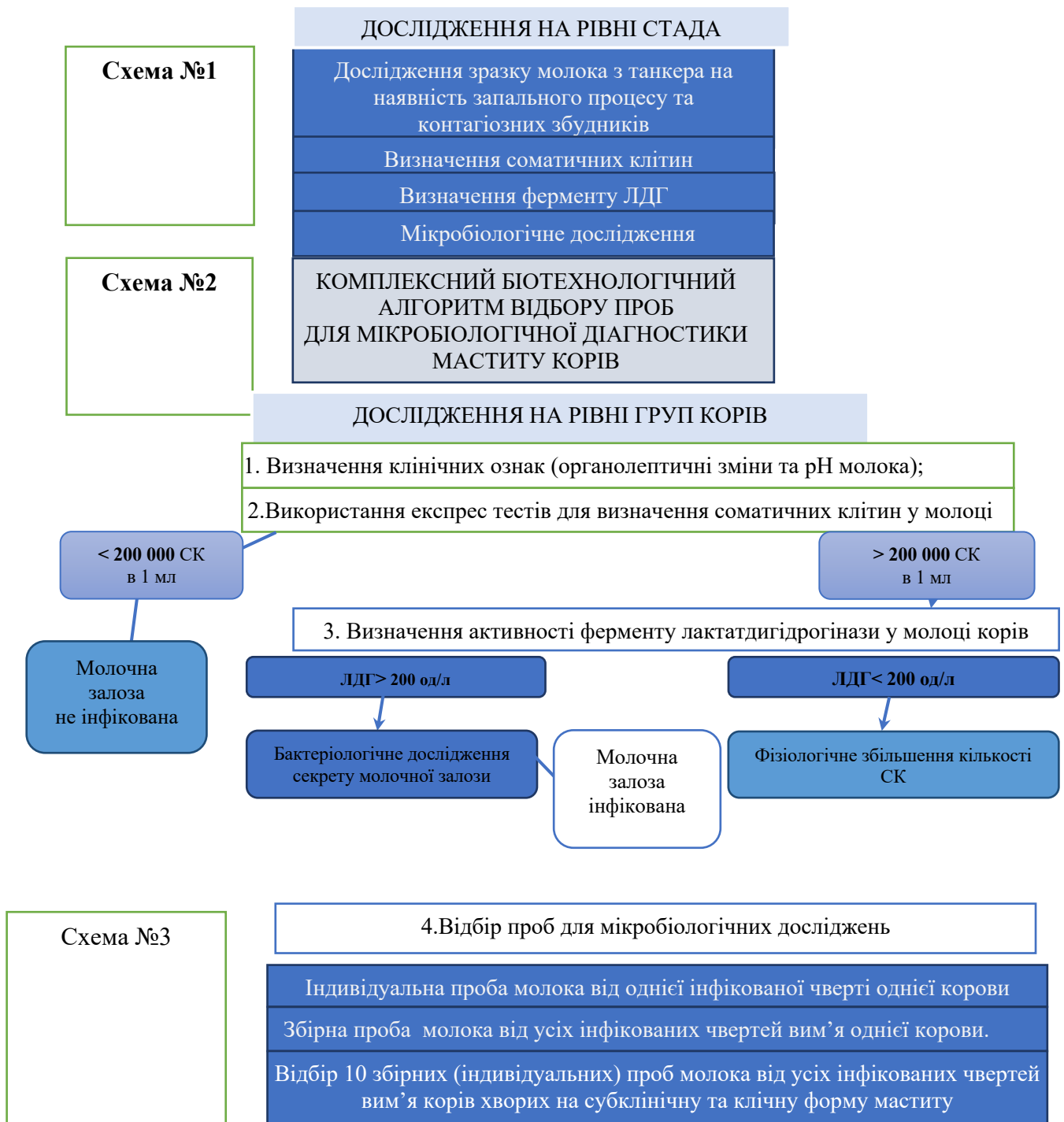
Підхід 2. Індивідуальні проби:

- а) відбір збірної проби молока від інфікованих чвертей вимені корови;
- б) відбір проби від однієї інфікованої чверті вимені корови.

(Схема № 3);

4. Слід відбирати проби молока у корів після отелення; Корів із клінічними ознаками артрити, кон'юнктивіту, вульвовагініту, новопридбаних корів та телиць перед приєднанням до стада необхідно помістити на карантин для здійснення тестування на наявність в їхньому організмі збудників маститу (Схема № 4);

5. Усі тварини з позитивним результатом на контагіозні збудники мають утримуватися окремо від здорових тварин. Таких корів слід лікувати антибіотиками, до яких бактерії проявляють чутливість та доїти їх після здорових тварин



ВИСНОВКИ

Таким чином, в ході дисертаційної роботи розроблений комплексний науковий біотехнологічний підхід до діагностики контагіозних маститів на фермах України, що полягає в належному відборі зразків молока хворих корів на субклінічний мастит та поетапному застосуванні комплексу діагностичних методів.

1. Визначено інфекційну етіологію маститу корів та встановлено, що основними збудниками запалення молочної залози є мікроорганізми, які представлені: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, що виділялись в різних асоціаціях, та *Mycoplasma spp.*
2. Проаналізовано чутливість та антибактеріальну резистентність збудників до антимікробних препаратів. Встановлено, що збудники контагіозного маститу є чутливими до амоксициліну, амоксициліну + клавуланової кислоти, гентаміцину, ампіциліну, лінкоміцину, флоксациліну, рифампіцину, бацитрацину, цефалексину та триметоприму; стійкими до тилозину та стрептоміцину.
3. Виявлено методом РТ-ПЛР генетичний матеріал *Mycoplasma bovis* на 10 фермах України з Миколаївської, Полтавської, Харківської, Київської області, що дає нам підставу зробити висновок про поширеність збудника на території України.
4. Проведено паралельне дослідження підрахунку кількості соматичних клітин та бактеріологічного культивування та визначено, що при низьких значеннях соматичних клітин в молоці (180 000 клітин в 1 мл. молока) можливо спостерігати субклінічне інфікування молочної залози корів.
5. Підтверджено, що при низьких значеннях соматичних клітин в молоці доцільно використовувати тест на лактатдегідрогеназу.
6. Впроваджено визначення ферменту лактатдегідрогенази у протоколи ТОВ «ЦВД», як допоміжного аналізу для визначення контагіозних субклінічних маститів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у наукових фахових виданнях України:
(які входять до переліку ВАК/ МОН України)*

1. Mazurenko VR., Ponomarenko TO. Controlling of *Mycoplasma bovis* at a farm in ukraine as a part eradication program of mastitis. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2017;3(3):26–29. *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку*

2. Mazurenko VR., Manchulyak OV. Biomarkers of subclinical mastitis in the mammary gland of cows. Biotechnologia Acta.2017;10(4):53-54. *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку*

Статті в іноземних виданнях:

3. Mazurenko VR, Dreval DV, Sobko IO. Biodiversity of species and antimicrobial resistance of bovine milk with clinical and subclinical mastitis. Bacterial empire. Scicell. 2020;3(4):77-80. (Республіка Словачія) *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку*

Тези наукових доповідей

1. Мазуренко ВР (Хайруліна), Нечипоренко ОО. Перспективи використання штамів *Bacillus sp.* 1.1 та *B. amyloliguefaciens* ІКМ В-5113 для профілактики маститів корів. Фундаментальні та прикладні дослідження в біології; 2014 лютий 23-24; Донецьк, Україна.2014, С. 286. **(усна доповідь)**
2. Мазуренко ВР (Хайруліна). Оцінка вмісту лізоциму в секреті вимені корів хворих на субклінічний мастит. Імунологія та алергологія додаток №1 Мікробіологія та імунологія перспективи розвитку в ХХІ столітті;2014 квітня 10-11; Київ, Україна.2014.С 166. **(стендова доповідь)**
3. Mazurenko VR., Mazurenko OV, Chvostenko OG. Bactericidal effect of post-milking teat dip by «Povidon-Protect». II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century; 2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine.2016. P.119; **(стендова доповідь)**
4. Mazurenko VR, Sobko IO. Evaluate effectiveness of different antibiotics and prevalence of contagious mastitis pathogens on dairy farms in Ukraine. II International Scientific Conference, Microbiology and Immunology – the development outlook in the 21st century”;2016 April 14-15; Kyiv, Ukraine.2016. P.114; **(усна доповідь).**
5. Mazurenko VR, Sobko IO, Molozhava OS, Kolybo DV. Milk analysis by flow cytometry to identify subclinical mastitis. Інноваційні наукові дослідження: світові тенденції та регіональний аспект; 2020 листопада 27-28; Харків, Україна 2020. с.11-14. **(публікація тез).**

АНОТАЦІЯ

Мазуренко В. Р. Комплексна біотехнологічна діагностика контагіозного маститу корів – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20. «Біотехнологія». – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, м. Київ, 2021.

Біотехнологічний процес харчової промисловості прагне забезпечити ринок якісними та цінними харчовими продуктами, що можуть бути отримані тільки з використанням молока високої якості. Заходи, що забезпечують належну якість молока: підтримка здоров'я молочної залози шляхом постійної профілактики хвороби вимені, визначення і виключення мікробіологічних та хімічних джерел забруднення.

У дисертаційній роботі проаналізовано знання про механізми патогенезу та розвитку маститу. Виникнення нових штамів бактерій з мультирезистентністю до антибіотиків сприяє пошуку нових ефективних терапевтичних засобів для лікування. Отже, контроль збудників є обов'язковою умовою для профілактики та лікування маститу.

Проведена оцінка розповсюдження бактеріальних ізолятів на фермах України дозволяє стверджувати, що поширення патогенних збудників зростає та потребує розв'язання актуальної проблеми. Запропоновано удосконалені біотехнологічні схеми діагностики контагіозного маститу у корів на фермах.

Ключові слова: Субклінічний мастит, контагіозні збудники, лактатдегідрогеназа, соматичні клітини, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*.

ANNOTATION

Mazurenko V.R — Comprehensive biotechnological diagnosis of contagious mastitis in cows. Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.20 — biotechnolodgy. National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, 2021.

Mastitis (inflammation of the mammary gland) in dairy cattle is a multifactorial disease, which still is a main cause of economic problems in the developed countries. The knowledge about the mechanisms of pathogenesis and development of mastitis is gradually expanding, and emergence of new multiresistant to antibiotics bacterial strains encourages the search for new effective therapeutic options for treatment. So, the control of the pathogens is a mandatory condition for the prevention and treatment of mastitis.

Biotechnological process of the food industry craves to provide the market with quality and valuable food that can only be obtained by using high-quality milk. As for the milk quality, it is influenced by the following indicators: the number of somatic cells, the absence of pathogenic bacteria and inhibitors (residues of veterinary drugs, antibiotics, hormones, etc.), exogenous contamination.

There are measures to ensure proper milk quality, such as: maintaining breast health by constantly preventing udder disease, identifying and eliminating microbiological and chemical sources of contamination. Many countries around the world are now paying close attention to the study of udder disease, its etiology and prevention.

In this regard, the search for new measures to increase milk productivity and improve milk quality is relevant and has scientific and practical significance. The thesis is devoted to the identification of bacterial isolates taken from Ukrainian milk cows. The author analyzed the antibiotic sensitivity and antibiotic resistance of bacteria. For the first time in Ukraine, the use of lactate dehydrogenase for the initial detection of early subclinical infection has been proposed. The assessment of the spreading of bacterial isolates on farms in Ukraine suggests that the prevalence of pathogens is growing and this issue needs to be addressed.

The study has shown that in case of subclinical infection of mammary gland 100 % of selected isolates are contagious mastitis pathogens. However, due to analyzed mastitis samples (clinical and subclinical forms) from different farms of Ukraine, it was found that 15 % of samples were positive for *Staphylococcus aureus* and 26 % of samples – for *Streptococcus agalactiae*, 59 % of samples contained non-contagious pathogens of mastitis.

In addition, it is shown that most isolates of bacteria that cause mastitis are sensitive to amoxicillin + clavulanic acid and gentamicin – 93.5% of all samples. Contagious mastitis pathogens susceptible to Amoxicillin, Amoxicillin + Clavulanic acid, Gentamicin, Ampicillin, Lincomycin, Cloxacillin, Rifampicin, Bacitracin, Rifampicin, and Trimethoprim; resistant to Tylosin and Streptomycin. It is also illustrated that *Streptococcus agalactiae*, *Candida spp*, *Aspergillus spp* have a 100 % effect compared to *Escherichia coli* 75 %, *Staphylococcus aureus* 70 % bactericidal effect after milking cows. The obtained data shows that for optimal results it is necessary to check the sensitivity of disinfectants before use.

Having tested 20 samples of milk for the presence of genetic material *Mycoplasma bovis* was found in 10 of them which is a reason to talk about the spread of this disease in the country.

The research findings illustrated that 2 out of 20 milk samples have low levels of the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) and somatic cells of the level was 250,000 in 1 ml. and negative bacteriological test results, which may indicate the absence infection of mammary gland and physiological increase in the amount of SC in secretion. With increased activity of the LDH enzyme and the level of SC, which does not exceed 250,000 in 1 ml, in every single case either bacteria *Streptococcus agalactiae* or *Staphylococcus aureus* was isolated, indicating monoinfection. At the level of SC from 250,000 to 500,000 in 1 ml (4 out of 20 milk samples) both bacteria

Streptococcus agalactiae and *Staphylococcus aureus* were isolated, which indicated a mixed infection.

Using the flow cytometry, the following indicators were detected: Precipitate of SC necrotic cells in cows without mastitis are 24 % compared with 67 % in cows with mastitis. The number of apoptotic SC in cows without mastitis is 33 % compared with 12 % in cows with mastitis. As a result, we conclude that apoptosis is closely related to the function of neutrophils and macrophages and plays a key role in protecting against pathogens and the physiology of the inflammatory response.

The novelty of the work is as follows for the first time, a scientific approach to monitoring udder health status of cows for subclinical inflammation has been improved. It is established that as a result of control of contagious pathogens on the farm the quality of cow's milk will improve. A determination of the enzyme lactate dehydrogenase as biomarkers of inflammation of the udder and reasonably complex combination of biological research methods for the determination of infectious agents in secret udder of cows.

The genetic material of *Mycoplasma bovis* DNA was found on 10 farms of Ukraine from Mykolayiv, Poltava, Kharkiv, Kyiv regions, which gives grounds to draw a conclusion about the prevalence of the pathogen on the territory of Ukraine. it is possible to observe subclinical infection of the mammary gland of cows.

Thus, as a result of a complex combination of biological research methods, a scientific approach to monitoring udder health status for the presence of subclinical inflammation on the farm is justified, which will help to qualitatively perform microbiological analysis of milk by dividing samples into groups. And in the group of animals.

In order to identify contagious pathogens and provide an early diagnosis of subclinical mastitis, a scientific approach to diagnosis on farms in Ukraine has been proposed and developed.

Key words: Subclinical mastitis, contagious pathogens, lactate dehydrogenase, somatic cells, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis*.